

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 10 OCT 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 33 737.3

Anmeldetag:

24. Juli 2002

Anmelder/Inhaber:

Morphochem Aktiengesellschaft für kombinatorische
Chemie, München/DE

Bezeichnung:

Verwendung von Modulatoren des Signaltransdukti-
onswegs über die Proteinkinase Fyn zur Behandlung
von Tumorerkrankungen

IPC:

A 61 K 31/5513

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 1. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

BEST AVAILABLE COPY

Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von
5 Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn (wie z. B. Rho-Kinase Inhibitoren) zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Therapie von Neuroblastomen.

Neuroblastome sind bösartige Krebserkrankungen des peripheren sympathischen Nervensystems, die im Kindesalter auftreten. Sie sind eine der häufigsten bösartigen Krebserkrankungen im Kindesalter. Bundesweit erkranken jährlich ca. 150-200 Kinder an diesem Tumor, der in fortgeschrittenen Stadien weitgehend un-
15 heilbar ist. Der Verlauf der Krankheit ist je nach Einzelfall unterschiedlich und reicht von einer spontanen Rückbildung bis zum progressiven Verlauf und zur Bildung von Metastasen. Der Tumor entwickelt sich aus Vorläuferzellen des autonomen Nervensystems, welches die unwillkürlichen Funktionen, wie Herz- und Kreislauf, Darm- und Blasentätigkeit, steuert. Es sterben
20 insgesamt ca. 40 % der erkrankten Kinder innerhalb der ersten fünf Jahre.

Ein genetisches Kriterium, das als Begründung für eine ungünstige Prognose dient, ist die Amplifikation des MYCN-Gens, die
25 zur deregulierten Expression des N-Myc Proteins im Tumorgewebe führt. N-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression sowohl positiv als auch negativ kontrollieren kann. Anhand eines Zellkultur-Modells wurde gezeigt, daß Myc-Proteine
30 sowohl das Zellwachstum als auch die Zellproliferation regulieren.

Derzeitige klinische Untersuchungen ziehen für eine Prognose des Neuroblastoms drei Kriterien heran:

das Stadium des Tumors, das Alter des Patienten und die Amplifikation des MYCN-Gens. Die Amplifikation des MYCN-Gens ist jedoch kein verlässliches Kriterium, da auch Tumore sich entwickeln können, die kein amplifiziertes MYCN-Gen aufweisen.

Demgegenüber ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, genetische Unterschiede in denjenigen Signaltransduktionswegen, welche die Proliferation und Differenzierung des Neuroblastoms kontrollieren, zur Prognose und Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere des Neuroblastoms, zu nutzen.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue Methoden zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere des Neuroblastoms, bereitzustellen.

20 Mittels einer Microarray-Analyse wird parallel die Expression einer großen Zahl von Genen in einer beliebigen Zahl von Proben von vielen Patienten, die alle an einem Neuroblastom erkrankt sind, gemessen. Anschließend erfolgt eine statistische Analyse, in der klinische Parameter mit den Expressionsdaten korreliert werden und somit Gene identifiziert werden, die kausal am Tumorverlauf beteiligt sind. 25 Durch Identifikation der Gene, die kausal am Tumorverlauf beteiligt sind, eröffnen wir die Möglichkeit einer kausalen Therapie der Erkrankung.

Die Expression der aufgefundenen Gene (Figur 2) korreliert mit spezifischen Tumorstadien. Überraschenderweise gehört ein Großteil dieser Gene zu einem Signaltransduktionsweg, der über die Proteinkinase Fyn verläuft. Von diesem

5 Signaltransduktionsweg ist bekannt, daß er in Zellkulturen Zelladhäsion, Zellproliferation und Differenzierung reguliert. Änderung in der Zelladhäsion sind für die Bildung von Metastasen verantwortlich, Zelldifferenzierung und -proliferation kontrollieren das eigentliche Tumorstadium. Es wird gezeigt, daß die Daten durch unabhängige Meßmethoden validiert werden können. Figur 3 zeigt Westernblotverfahren (Messungen der Proteinmenge) und Aktivitätsbestimmungen der Fyn-Kinase. Alle Messungen zeigen, daß die Signaltransduktion durch Fyn in fortgeschrittenen Tumorstadien abgeschaltet wird.
15 Dabei unterstreichen die Expressionsanalysen die Rolle des Fyn-Signaltransduktionsweges für die Bildung von Metastasen.

Darüber hinaus weisen wir in Figur 4 nach, daß Fyn eine kausale Rolle in den genannten Prozessen im Neuroblastom hat. An-
20 hand zweier verschiedener Zelllinien aus dem Neuroblastom wird gezeigt, daß die Expression von Fyn, also die Reaktivierung der Signaltransduktion zu einem Wachstumsarrest, zu erhöhter Adhäsion und zur Differenzierung von Neuroblastomzellen in Kultur führt. Damit haben wir nachgewiesen, daß der Verlust
25 der Signaltransduktion durch Fyn ursächlich für die genannten biologischen Prozesse ist.

Mit Hilfe einer Microarray-Analyse humaner Tumorproben aus dem Neuroblastom wurde überraschend gefunden, dass der
30 Signaltransduktionsweg über die Proteinkinase Fyn das Tumorstadium sowie die Bildung von Metastasen reguliert. Des

weiteren wurde gefunden, dass die Signaltransduktion durch Fyn im fortgeschrittenem Tumorstadium abgeschaltet wird. Die Beeinflussung des Signaltransduktionsweges via Fyn Kinase, insbesondere die (Re-)Aktivierung des im Neuroblastom herunter regulierten Signaltransduktionsweges via Fyn stellt eine
5 Therapiemöglichkeit für die Behandlung von Neuroblastomen dar.

Durch den Einsatz von Modulatoren des Signaltransduktions-wegs über die Proteinkinase Fyn ist es erfindungsgemäss möglich, das Tumorwachstum sowie die Bildung von Metastasen zu unterbinden, und damit Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) zu behandeln.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft
15 Modulatoren des Signaltransduktionsweges über die Proteinkinase Fyn, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Enzymen sind, die direkt oder indirekt durch aktives Fyn inhibiert werden.

20 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in den Tumorzellen führen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, wobei die Modulatoren Inhibitoren der Proteinkinase CSK, Inhibitoren der Rho-Kinase, Inhibitoren der MAP-Phosphatase oder Aktivatoren der Protein Kinase C sind.
25

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen.
30

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Phosphatasen sind, die Fyn entgegenwirken.

5

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionsweges via Proteinkinase Fyn zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung der Metastasenbildung von Tumoren im Frühstadium, wobei der Tumor ein pädiatrischer oder ein adulter Tumor sein kann.

15

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Modulatoren wie oben beschrieben als Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung neben dem Modulator als Wirkstoff gegebenenfalls Trägerstoffe und/oder Adjuvantien umfaßt.

20

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator in Form eines pharmakologisch akzeptablen Salzes, Solvates, Hydrates, oder einer pharmakologisch akzeptablen Formulierung vorliegt.

25

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator als Prodrug vorliegt, umfassend den Modulator

30

und mindestens eine pharmakologisch akzeptable Schutzgruppe, die unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft

- 5 Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator oral, parenteral, rektal, durch Inhalation, transdermal oder intranasal verabreicht wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

- Um eine Einsicht in die molekulare Abfolge der Entwicklung von Neuroblastomen zu erhalten, wurden Expressionsprofile von 94 individuellen Tumor-Gewebeproben erstellt, wobei ein humaner, unigener 4608-cDNA-Chip verwendet wird. Jeder Chip wird mit cDNA als Referenz hybridisiert, die sich von einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (SHEP) ableitet. Die Tumoren wurden dahingehend ausgewählt, daß sie die Verteilung der Tumorstadien und die MYCN-Amplifikation der gesamten Tumorbank (Tabelle 1) widerspiegeln. Um Vergleiche zwischen den einzelnen Spots und den Arrays zu ermöglichen, wurde jedes Signal in bezug auf seinen Hintergrund korrigiert, und die \log_2 -transformierten Rot/Grün-Intensitätsverhältnisse wurden berechnet und standardisiert. Eine t-Statistik mit zwei Proben und angepaßten p-Werten wurde verwendet, um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren (Callow et al., 2000). Die angepaßten p-Werte korrigieren gleichzeitig das Testen von 4608 Genen, und schätzen die Gesamtwahrscheinlichkeit für den Nachweis eines falschen Gens ab (siehe Methoden).

Wir fanden 123 unterschiedlich exprimierte Gene, als wir MYCN-amplifizierte (n = 17) und nichtamplifizierte (n = 77) Tumore verglichen (angepaßter p-Wert < 0,05). Diese Gene wurden in einem unkontrollierten, hierarchischen Cluster verwendet, und
5 die Analyse zeigte, daß alle Tumore mit Ausnahme von dreien in korrekter Weise einer der beiden Klassen zugeordnet wurden (Figur 1, Feld A). Eine funktionelle Zuschreibung zeigte, daß die meisten Gene, die in MYCN-amplifizierten Tumoren eingeschaltet waren, für Proteine codieren, die eine Rolle in der Proteinsynthese, im Stoffwechsel und in der Regulation des Zellzyklus spielen (Figur 1, Feld A); dies stimmt mit den Mikroarray-Daten überein, die sich durch Verwendung induzierbarer Systeme in Zellkultur ergaben. Diese Ergebnisse zeigen, daß Myc-Proteine sowohl das Zellwachstum, als auch die Zell-
15 Proliferation regulieren, und daß die anhand der Zellkultur entwickelten Modelle sich auf die Entstehung des Neuroblastoms erstrecken. Die Expression einer Reihe von Genen, welche als Zielgene von (c-)Myc in Zellkultur-Experimenten identifiziert wurden, war in bezeichnender Weise bezüglich beider Klassen
20 von Tumoren verschieden (Figur 1, Feld b). Eine große Gruppe von Genen, die meist in MYCN-amplifizierten Tumoren abgeschaltet waren, codieren für Proteine, die in vielstufigen Signaltransduktionswegen involviert sind. Dies zeigt, daß Myc-Proteine ein negatives Rückkopplungssignal für Sig-
25 naltransduktionswege darstellen (Figur 1, Feld A). Überraschenderweise codieren die Zellzyklus-Gene, die in MYCN-amplifizierten Tumoren verstärkt auftreten, für Proteine, die dafür bekannt sind, daß sie als Reaktion an einem Kontrollpunkt (checkpoint response), oder in der G2- oder M-Phase des
30 Zyklus fungieren, was auf eine neue Funktion von Myc bei der

Kontrolle und im späten Zellzyklus hindeutet (Figur 1, Feld c).

Die Deregulierung dieser Gene kann in einfacher Weise das fortgeschrittene Tumorstadium der meisten MYCN-amplifizierten Tumore widerspiegeln (Tabelle 1). Um diese Möglichkeit auszuschließen, haben wir ihre Expression zwischen dem Stadium 4 der MYCN-amplifizierten und der nichtamplifizierten Tumore verglichen (Figur 1, Feld d). Die Expression aller von uns analysierten Gene wurde durch MYCN-Amplifikation reguliert, unabhängig vom Tumorstadium. Umgekehrt könnte die Deregulation eine direkte Regulation durch N-Myc widerspiegeln. Mit dieser Vorstellung stimmt überein, daß vielfache E-Boxen im Promotor und den Introns der MAD2, CENPE und AURORA2-Gene vorhanden sind (Figur 1, Feld e). Tatsächlich zeigte die Chromatin-Immunpräzipitation, daß N-Myc *in vivo* an die E-Boxen der MAD2-Gene gebunden ist (Figur 1, Feld e). Wir haben daraus geschlossen, daß mindestens einige der von uns identifizierten Gene direkte Zielgene von N-Myc sind.

Tabelle 1

		STADIUM					Summe
		1	2	3	4	4S	
MYCN	Nicht-amplifizierte	19	8	17	21	12	77
	amplifizierte	1	1	4	8	3	17
Alter	< 12 Monate	18	1	11	5	15	50
	> 12 Monate	2	8	10	24	0	44
Alter	Mittelwert (Monate)	4.3	23.4	28.7	42.6	4.0	23.3
	Standradabweichung (Monate)	4.2	17.8	41.1	33.6	3.4	31.6
Summe		20	9	21	29	15	94

Tabelle 1: Klinische Parameter von 94 Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben. Alter und Stadium sind stark durcheinandergebracht, und aufgrund der geringen Zahl konnten sie nicht unabhängig analysiert werden.

5

Eine anfängliche Analyse ergab, daß von den nicht-MYCN-amplifizierten Tumoren die Stadien 1 und 4, nicht jedoch die Stadien 2, 3 und 4S, Unterschiede in ihren Expressionsprofilen zeigen (Daten nicht gezeigt). Wir fanden 36 bezeichnende Gene, die in Tumoren im Stadium 1 (n = 19) und im Stadium 4 (n = 21) unterschiedlich exprimiert waren (angepaßter p-Wert < 0,2) (Figur 2, Feld A). Dieser Satz von Genen zeigte eine geringe Überlappung mit der Gruppe von Genen, welche MYCN-amplifizierte von nichtamplifizierten Tumoren unterscheidet; eine funktionelle Zuschreibung der Gene ergab, daß die Gene, welche für Proteine codieren, die im Stoffwechsel und der Proteinsynthese eine Rolle spielen, von der Gruppe der Stadium-spezifischen Gene scheinbar abwesend waren, im Gegensatz zu den Genen, die für MYCN-amplifizierte Tumore charakteristisch waren (Figur 2, Feld A). Im Gegensatz dazu codiert ein charakteristischer Prozentsatz von Genen, die unterschiedlich exprimiert waren, für Gene, die in die Signalübertragung durch die Non-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn und das Actin Cytoskeleton involviert sind; diese Gene waren in koordinierter Weise im fortgeschrittenen Stadium des Neuroblastoms herabreguliert (Figur 2, Feld b und c). Diese Gruppe umfaßt Fyn selbst, das Actin-Filament-Bindeprotein (AFAP), ein Protein, das an Src und Fyn-Kinase bindet und diese aktiviert; α -Catenin (CTNNA1), ein actin-bindendes Protein, dessen Bindung an β - und γ -Catenin durch Fyn-abhängige Phosphorylierung reguliert wird; das neurale Zell-Adhäsionsprotein NRCAM, welches durch Non-Rezeptor Tyrosin-Kinasen

10

15

20

25

30

und die actin-bindenden Proteine Tropomodulin und MARCKS signalisiert.

Der Westernblot bestätigte die verminderte Expression von Fyn
5 in Tumoren des Stadiums 4, im Vergleich zum Stadium 1 (Figur
3, Feld A); zusätzlich ergab das Experiment in übereinstimmender Weise eine langsamere Wanderung des Fyn-Proteins in Extrakten aus allen Tumoren des Stadiums 1, verglichen mit denen des Stadiums 4, was zeigt, daß die autophosphorylierte (aktive) Form vorliegt (Figur 3, Feld A).

Phosphatasebehandlung bestätigte, daß die unterschiedliche
Wanderung aufgrund der Phosphorylierung zustandekam (Figur 3,
Feld A). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde
eine hohe Fyn-Kinaseaktivität in Gewebeproben aus Tumoren des
15 Stadiums 1 übereinstimmend erhalten, wobei Immunkomplex
Kinase-Assays verwendet wurden, die sowohl die Autophosphorylierung (Figur 3, Feld B - D) als auch die Phosphorylierung des exogenen Substrats, Enolase (Wolf et al., 2001) messen. Im Gegensatz dazu war die Fyn-Kinaseaktivität in
20 Extrakten aus Tumoren des Stadiums 4 variabel und im
Durchschnitt wesentlich niedriger (Figur 3, Feld B - D).

Um zu testen, ob Fyn eine Rolle in der Differenzierung und Regulation der Zell-Proliferation von Neuroblastomzellen spielt,
25 verwendeten wir eine vorübergehende Transfektion, um Fyn in SH-SY5Y-Zellen zu exprimieren - eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die sich aus einem Tumor im Stadium 4 ableitet (Pahlman et al., 1981). Die Expression von Wild-Typ Fyn induzierte die Ausbildung von vielfachen Neuriten und
30 offenkundigen morphologischen Charakteristika der Differenzierung (Figur 4, Feld A; eine Quantifizierung der Er-

gebnisse ist in Feld b gezeigt). Eine Färbung mit Antikörpern, die gegen Cyclin A als ein Markerprotein der Zell-Proliferation gerichtet sind, ergab, daß die Zellen, welche aktives Fyn exprimierten, aus dem Zellzyklus ausgestiegen waren (Figur 4, Feld e). Zellen, die eine kinase-negative Allele (FynK299M) exprimierten, zeigten im Gegensatz dazu keine Zeichen von morphologischer Differenzierung (Figur 4, Feld A). Übereinstimmend mit der Rolle von AFAP bei der Aktivierung von Fyn induzierte die Expression einer konstitutiv aktiven Allele von AFAP morphologische Veränderungen, die stark an aktives Fyn erinnern, während eine dominant-negative Allele von AFAP die Differenzierung nicht beeinflußt (Figur 4, Feld c).

Wir wiederholten die Experimente in IMR-32-Zellen, einer humanen Neuroblastom-Zelllinie, die ein amplifiziertes MYCN-Gen trägt (Clementi et al., 1986). Ähnlich den in SH-SY5Y-Zellen erhaltenen Ergebnissen induzierte die Expression der aktiven Fyn-Kinase eine Neuritenausbildung und einen Ausstieg aus dem Zellzyklus (Figur 4, Feld c und d). Dies zeigt, daß die Induktion der Differenzierung durch Fyn auch in Gegenwart eines amplifizierten MYCN-Gens stattfindet. Dies stimmt mit dem Befund überein, daß die Expression von FYN, AFAP, NRCAM und CTNNA1 gleichermaßen in MYCN-amplifizierten ebenso wie in nicht-amplifizierten Tumoren, in bezug auf Tumore im Stadium 1, herabreguliert ist (Figur 2, Feld c).

Insgesamt identifizierten wir zwei genetische Programme, welche die Entwicklung von Neuroblastomen regulieren, eines, welches durch die Amplifikation des MYCN-Gens kontrolliert wird, und ein zweites, stadium-spezifisches Programm der

Genexpression. Beide Programme sind in hohem Maße unabhängig voneinander, da (a) beide Gruppen von Genen geringe Überlappung zeigen, (b) die Gene durch die MYCN-Amplifikation herabreguliert sind, unabhängig vom Tumorstadium, und (c) die Tumorstadium-spezifischen Gene herabreguliert sind, unabhängig von der MYCN-Amplifikation. Die deregulierte Expression von MYCN aktiviert Gene, die für Proteine codieren, welche sowohl am Fortschreiten des Zellzyklus als auch am Zellwachstum beteiligt sind, und unterdrückt Gene, welche für Proteine codieren, die in vielstufige Signalprozesse in einem menschlichen Tumor involviert sind. Diese Befunde zeigen spezifisch, daß Myc-Proteine die Genexpression in der G2-Phase des Zellzyklus kontrollieren, und Gene aktivieren, die in Kontrollpunkt-Prozessen (checkpoint processes) involviert sind.

Unsere Daten zeigen, daß die Fyn-Kinase die Proliferation und die Differenzierung von Neuroblastomzellen *in vivo* reguliert; dies wird ebenso durch den Befund unterstützt, daß das Stadium-spezifische Expressionsprofil ein Überleben vorhersagt. Detaillierte Expressionsprofile von individuellen Tumorstadien ergaben, daß die Herabregulierung von Fyn am auffälligsten zwischen den Stadien 1 und 2 ist, welche mit der Bildung von Metastasen in den lokalen Lymphknoten korreliert (Figur 2, Feld c). Die Herabregulation von Fyn und ebenso die veränderte Zelladhäsion steuern die Bildung von lokalen Metastasen *in vivo*.

Aktives Fyn kann seine Funktion auf mehrere Arten ausüben: In neuronalen Zellen phosphorylieren Non-Rezeptor Tyrosin-Kinasen Rho-GAP, was zur Inaktivierung von Rho und der Induktion der

Differenzierung führt. Es wurde gefunden, daß es Moleküle in Signalübertragungswegen gibt, welche durch Fyn-Signalisierung inhibiert werden, was sie zu Kandidaten für einen therapeutischen Eingriff macht. Die Beeinflussung des Signalübertragungsweges abwärts von Fyn stellt erfindungsgemäß einen therapeutischen Zugang für Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium bereit.

Bevorzugte Zielmoleküle im Fyn-Signaltransduktionsweg sind dabei solche, die durch Fyn Signaltransduktion inhibiert werden.

Bevorzugte Modulatoren sind Inhibitoren von Enzymen, die direkt oder indirekt durch aktives Fyn inhibiert werden.

15 Weiter bevorzugt sind Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in Tumorzellen (bevorzugt in Neuroblastomen) führen.

20 Besonders bevorzugt sind Inhibitoren der Proteinkinase CSK, die in Neuroblastomen exprimiert wird und in vivo ein negativer Regulator von Fyn ist.

Des weiteren bevorzugt sind Modulatoren, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen wie z. B. generelle Inhibitoren des Proteasoms (LLNL, MG132) oder spezifische Inhibitoren der beteiligten E3-Ligasen.

Weiter bevorzugte Modulatoren sind Inhibitoren von Phosphatasen, die Fyn entgegenwirken wie z. B. MAP-Kinase Phosphatase 1.

Wiederum bevorzugt sind Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen wie z. B. Rho Kinase Inhibitoren, MAP Phosphatase Inhibitoren oder Aktivatoren der Proteinkinase C.

5

Des weiteren sind von der vorliegenden Erfindung auch pharmakologisch akzeptable Salze, Solvate, Hydrate oder pharmakologisch akzeptable Formulierungen der beschriebenen Modulatoren umfasst.

Beispiele für pharmakologisch akzeptable Salze sind Salze von physiologisch akzeptablen Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure oder Salze von organischen Säuren wie Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Milchsäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Salicylsäure. Die erfindungsgemäßen Modulatoren können solvatisiert, insbesondere hydratisiert sein. Die Hydratisierung kann z.B. während des Herstellungsverfahrens oder als Folge der hygroskopischen Natur der anfänglich wasserfreien Verbindungen auftreten. Wenn die beschriebenen Modulatoren asymmetrische C-Atome enthalten, können sie entweder als Diastereomeren-Gemische, Gemische von Enantiomeren oder als optisch reine Verbindungen vorliegen.

20

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten mindestens einen der beschriebenen Modulatoren als Wirkstoff und fakultativ Trägerstoffe und/oder Adjuvantien.

30

Die Pro-Drugs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, bestehen aus einem erfindungsgemässen Modulator und mindestens einer pharmakologisch akzeptablen Schutzgruppe, die unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird, z.B. einer Alkoxy-, Aralkyloxy-, Acyl- oder Acyloxy-Gruppe, wie z.B. einer Ethoxy-, Benzyloxy-, Acetyl- oder Acetyloxy-Gruppe.

Auch die Verwendung der Modulatoren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Im allgemeinen werden die Modulatoren unter Anwendung der bekannten und akzeptablen Modi, entweder einzeln oder in Kombination mit einem beliebigen anderen therapeutischen Mittel verabreicht. Solche therapeutisch nützlichen Mittel können auf einem der folgenden Wege verabreicht werden: oral, z.B. als Dragees, überzogene Tabletten, Pillen, Halbfeststoffe, weiche oder harte Kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen; parenteral, z.B. als injizierbare Lösung; rektal als Suppositorien; durch Inhalation, z.B. als Pulverformulierung oder Spray, transdermal oder intranasal. Zur Herstellung solcher Tabletten, Pillen, Halbfeststoffe, überzogenen Tabletten, Dragees und harten Gelatinekapseln kann das therapeutisch verwendbare Produkt mit pharmakologisch inerten, anorganischen oder organischen Arzneimittelträger-substanzen vermischt werden, z.B. mit Lactose, Sucrose, Glucose, Gelatine, Malz, Silicagel, Stärke oder Derivaten derselben, Talkum, Stearinsäure oder ihren Salzen, Trockenmagermilch und dgl. Zur Herstellung von weichen Kapseln kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle, Wachse, Fette, Polyole einsetzen. Zur Herstellung von flüssigen Lösungen und Sirups kann

man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. Wasser, Alkohole, wäßrige Salzlösung, wäßrige Dextrose, Polyole, Glycerin, pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle verwenden. Für Suppositorien kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle, Wachs, Fett und Polyole verwenden. Für Aerosol-Formulierungen kann man komprimierte Gase, die für diesen Zweck geeignet sind, wie z.B. Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid einsetzen. Die pharmazeutisch verwendbaren Mittel können auch Zusatzstoffe zur Konservierung, Stabilisierung, Emulgatoren, Süßstoffe, Aromastoffe, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Umhüllungszusatzstoffe und Antioxidantien enthalten.

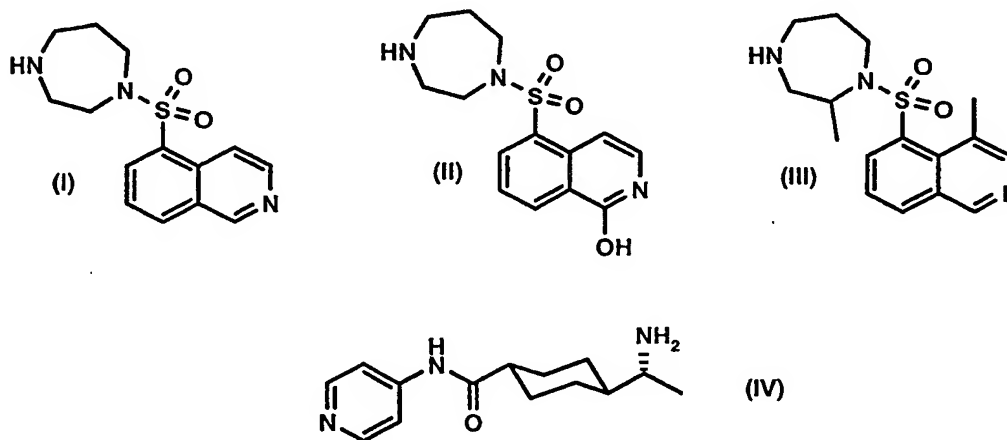
15 Kombinationen mit anderen therapeutischen Mitteln können andere Wirkstoffe beinhalten, die gewöhnlich zur Behandlung von Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) eingesetzt werden.

20 Zur Vorbeugung und/oder Behandlung der oben beschriebenen Erkrankungen kann die Dosis der erfindungsgemäßen Modulatoren innerhalb breiter Grenzen variieren und kann auf den individuellen Bedarf eingestellt werden. Im allgemeinen ist eine Dosis von 0,1 µg bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag geeignet, 25 wobei eine bevorzugte Dosis 0,5 bis 10 mg/kg pro Tag ist. In geeigneten Fällen kann die Dosis auch unter oder über den oben angegebenen Werten liegen.

Beispiele

Beispiele für Rho Kinase Inhibitoren sind in EP0370498, US4997834, EP0956865, US6218410, US4678783, US6153608,

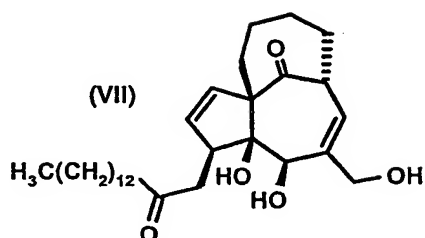
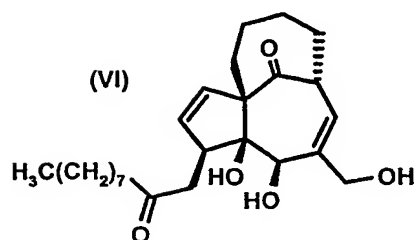
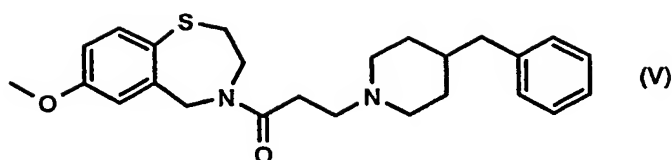
5 EP0885888, WO0168607 und WO0156988 beschrieben. Konkret seien hier Verbindungen I (Fasudil), II (Hydroxyfasudil), III und IV genannt:



10

Beispiele für Aktivatoren von Proteinkinase C sind Verbindung V, die Verbindung EP-70905 von Europeptides, die Naturstoffe Bryostatin, Teleocidin, Aplysiatoxin sowie Ester von Phorbol

15 und Ingenol. Weitere Verbindungen wie VI und VII sind in J. D. Winkler et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 296-300 beschrieben.



Ein Beispiel für einen MAP Kinase Phosphatase 1 Inhibitor ist
5 die Verbindung MX 7091 von Maxima Pharmaceuticals.

Ein Beispiel für einen CSK Inhibitor ist der Naturstoff Stau-
rosporin.

10

Material und Methoden

Microarray-Experimente

15 Der verwendete Chip enthält den cDNA-Satz gf200 von Research
Genetics (<http://www.resgen.com>), sowie 100 cDNA zusätzlich,
die bereits vorher als potentiell für eine Prognose der Neuro-
blastom-Entwicklung geeignet beschrieben wurden (für
Einzelheiten siehe <http://www.imt.uni-marburg.de>). Jede cDNA
20 wurde zweimal pro Chip aufgetragen. Die Chips wurden wie in
Hegde et al., 2000 beschrieben hergestellt, unter Verwendung
eines GMS 417 Arrayer.

Eine anfängliche histochemische Untersuchung einer Reihe von 100 willkürlich ausgewählten Tumoren ergab, daß annähernd 95% der Tumore weniger als 5% Zellen in den Gewebeproben enthielten, die keine Tumorzellen waren (siehe Bergmann et al., 2001). Daher wurde kein weiterer Versuch unternommen, das Tumorgewebe vor der Präparation der RNA zu sezieren. Die gesamte RNA aus dem Neuroblastomgewebe und dem SHEP wurde unter Verwendung eines Qiagen RNA Isolationskits entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. 40 µg Gesamt-RNA wurde verwendet um Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierte cDNA entsprechend dem veröffentlichten Protokoll herzustellen (<http://brownlab.stanford.edu>). Die Chips wurden unter Verwendung eines GMS 418 Fluoreszenz-Scanners gescannt, und die Bilder wurden unter Verwendung der IMAGE 3.0 Software analysiert. Die Expressionsdaten wurden entweder durch Northern Blot-Analyse oder durch Real Time RT-PCR Assays bestätigt.

Standardisierung und Qualitätskontrolle

ImaGene 3.0: Die Softwareparameter wie "Signalbereiche" oder "Spotnachweis-Schwelle" (siehe Benutzerhandbuch von ImaGene für Einzelheiten) wurden vor der Bildanalyse unseres Experimentes auf eine maximale Reproduzierbarkeit optimiert. Für jeden Spot werden das mittlere Signal und die Hintergrund-Intensitäten für beide Kanäle erhalten. Um die Unterschiede der Spots zu bestimmen, wurde das korrigierte Hintergrundverhältnis der beiden Kanäle berechnet, und log₂-transformiert.

Um die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden Farbstoffe auszugleichen, sowie um einen Vergleich des Expressionsniveaus in Kreuzexperimenten zu ermöglichen, wurden die Rohdaten

standardisiert. Zunächst benutzten wir eine nadelweise (pin-wise) intensitätsabhängige Standardisierung (Yang et al., 2002), um eine inhärente Neigung auf jedem Chip zu korrigieren (the lowess scatter-plot smoother). In einem zweiten Schritt wurde eine allgemeine Standardisierung vorgenommen, um die logarithmierten Verhältnisse für jedes Array bei 0 zu zentrieren (um allgemeines Färben und Scannereffekte zu berücksichtigen). Da jedes Gen zweimal auf dem Chip aufgetragen wurde, wurden die mittleren logarithmischen Verhältnisse M aus den Kopien berechnet. Falls die Kopien um mehr als das Vierfache abwichen, oder die Hintergrund-Intensität höher war als die Signalintensität, wurde das Gen von diesem Array ausgeschlossen.

15 Statistische Analyse

Die finale Datenmatrix bestand aus 4608 standardisierten Genexpressionsmessungen (\log_2 -Verhältnisse) aus 94 individuellen Tumoren (mit fehlenden Werten). Um das Expressionsprofil zwischen zwei unabhängigen Gruppen zu vergleichen, wurde eine t-Statistik mit zwei Proben für jedes Gen benutzt. Um ein mehrfaches Testen zu berücksichtigen, berechneten wir die angepaßten p-Werte für jedes Gen, wobei wir einen schrittweise abwärts führenden (step down) Permutations-Algorithmus verwendeten (Westfall und Young, 1993, Algorithmus 4.1). Diese Strategie wurde früher auf Microarrays angewendet (Callow et al., 2000). Der Permutations-Algorithmus liefert eine strenge Kontrolle der familienweisen Fehlerrate (FWER), und berücksichtigt die Korrelation der Variablen (Gene). Das Verfahren verläßt sich nicht auf eine Normalitäts-Annahme; es wird angenommen, daß die t-Statistik für alle Gene asymptotisch die gleiche Nullverteilung besitzt, (oder daß die

p-Werte monoton in den beobachteten t-Statistiken über die Gene sind).

Cluster Analyse

- 5 Vor der Cluster Analyse wurde das Expressionprofil eines jeden Gens durch Subtraktion des mittleren beobachteten Wertes zentriert. Das durchschnittliche, verkettete hierarchische Zusammenfassen zu Clustern (average linkage hierarchical clustering) wurde dann für Gene sowie für Chips ausgeführt, wobei das euklidische Abstandsmaß wie in den Programm J-Express implementiert, verwendet wurde (Dysvik und Jonassen, 2001).

Westernblots, Immun-Präzipitation, Phosphatasebehandlung

- 15 Die folgenden Antikörper wurden in Westernblots, Immunfluoreszenz-Experimenten und Immun-Präzipitationen verwendet: α -Fyn: (sc-434); α -cdk2 (sc-163), α -cyclinA (sc-751), alle von Santa Cruz. Neuroblastomgewebe wurde lysiert wie beschrieben (Bergmann et al., 2001).
- 20 Für die Phosphatasebehandlung wurden 500 μ g zelluläre Proteine über Nacht bei 4°C mit 5 μ g FYN-Antikörper, der an Protein G Kügelchen gebunden ist, inkubiert. Immunkomplexe wurden entweder mit λ -Proteinphosphatase (NEB) inkubiert, oder mit λ -Proteinphosphatase und Phosphataseinhibitoren. Immunkomplexe wurden
- 25 den mittels einer 10% SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, und mit einem α -Fyn-Antikörper detektiert.

In vitro Kinase-Assays

- 30 500 μ g zelluläre Proteine wurden mit 5 μ g α -Fyn-Antikörper, der an Protein G Kügelchen gebunden ist, immunpräzipitiert,

gewaschen und in Kinase-Assaypuffer equilibriert, 15 Minuten mit 10 μ Ci γ -ATP (Amersham) und 0,125 mg/ml Enolase inkubiert, mittels einer 10% SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und getrocknet. Die Ergebnisse wurden auf einem Fuji Phosphoimager sichtbar gemacht, und unter Verwendung einer Bildeich-Software quantifiziert.

Chromatin-Immunpräzipitation

Chromatin-Immunpräzipitation wurde wie vorher beschrieben ausgeführt (Bouchard et al., 2001). Zellkernextrakte (nuclear extracts) wurden über Nacht bei 4°C mit 3 μ g α -N-Myc-Antikörper, oder Kontrollantikörper, der an Protein A und Protein G Kügelchen gebunden ist, immunpräzipitiert. Für die PCR-Analyse wurden ein spezifisches Primerpaar für Intron 1 von Prothymosin alpha (als Positivkontrolle), sowie Primerpaare, welche die angegebenen Regionen des MAD2 Genes amplifizieren, verwendet. Primersequenzen sind auf Verlangen erhältlich.

Zellkultur-Experimente

SH-SY5Y und IMR-32 Neuroblastom-Zelllinien werden in RPMI 1640 kultiviert, das mit 10% hitze-inaktiviertem FCS ergänzt ist. CMV-gesteuerte Expressionkonstrukte, die für Fyn-Wildtyp (Fynwt) und FynK299M kodieren, sind beschrieben (Wolf et al., 2001). Plasmide, die für AFAP Δ LZ und AFAP Δ 180-226 kodieren, wurden beschrieben (Baisden et al., 2001). Für vorübergehende Transfektionen ließ man die Zellen zunächst auf Deckstreifen 6 Stunden lang wachsen, die mit einer 1:5 Verdünnung von Matrigel (Becton-Dickinson) beschichtet waren. Die Transfektion wurde ausgeführt, indem 5 μ g DNA unter Verwendung eines Lipofektin-Reagenz (Invitrogen) eingesetzt wurden. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd nach 60 Stunden fixiert,

gewaschen und mit einem monoklonalen α -Fyn-Antikörper (Santa Cruz), oder einem α -AFAP polyklonalem Antikörper aus Kaninchen gefärbt (Baisden et al., 2001).

5

Legenden zu den Figuren

Figur 1: Identifikation von Genen, die für MYCN-amplifizierte Tumore charakteristisch sind.

10

Feld A: Hierarchische Cluster-Analyse aller Tumore unter Verwendung von 123 Genen (angepaßter p-Wert $< 0,05$), die unterschiedlich in MYCN-amplifizierten und nicht-amplifizierten Tumoren exprimiert werden. Sowohl Gene als auch individuelle Tumore sind in diesem Diagramm zu Clustern zusammengefaßt. Die grüne Farbe bezeichnet eine Regulation eines Gen nach unten in einem gegebenen Tumor, rote Farbe bezeichnet die Regulation nach oben, relativ zum Mittelwert. Die Tabelle auf der linken Seite stellt den angepaßten p-Wert sowie eine funktionelle Zuschreibung für jedes Gen bereit.

15

20

Feld B: Viele bekannte MYC-Zielgene sind in MYCN-amplifizierten, im Vergleich zu nicht-amplifizierten Tumoren unterschiedlich reguliert. Der Ausdruck in einem Kästchen (box-plot) zeigt die Verteilung der Genexpression für jede Gruppe. Weiße Kästchen zeigen die Expression in amplifizierten Tumoren an, graue Kästchen in nicht-amplifizierten Tumoren. Alle bekannten Zielgene bis zu einem angepaßten p-Wert von $p = 0,05$ sind aufgelistet.

25

30

Feld C: Kästchenausdrucke (box-plots) dokumentieren die verstärkte Expression vieler Gene, die am G2-Verlauf (G2 progression) und an den Kontrollpunkt-Funktionen (checkpoint functions) in MYCN-amplifizierten Tumoren beteiligt sind.

Feld D: Kästchenausdrucke (box-plots) dokumentieren die Expression von 10 unterschiedlich exprimierten Genen von MYCN-amplifizierten, gegenüber nicht amplifizierten Tumoren im Stadium 4. Die 10 Gene aus der Figur 1A mit den niedrigsten p-Werten sind gezeigt.

Feld E: MAD2 ist ein direktes Zielgen von MYCN. Das obere Feld zeigt die genomische Struktur des menschlichen MAD2-Gens, wobei die Lage der E-Boxen angezeigt ist. Das untere Feld zeigt eine Chromatin-Immunpräzipitation, welche die direkte Bindung des N-Myc an die Intron E-Boxen *in vivo* nachweist. "Con" bezeichnet einen Kontrollantikörper; "-ab" eine Kontrolle ohne Primärantikörper.

Figur 2: Identifizierung eines Genexpressionsmusters, das für Tumorstadien spezifisch ist.

Feld A: Hierarchische Cluster-Analyse von 21 spezifischen Tumoren im Stadium 4 gegenüber 19 spezifischen Tumoren im Stadium 1 unter Verwendung von 36 Genen (angepaßter p-Wert < 0,2), die in Tumoren im Stadium 4 und im Stadium 1 unterschiedlich exprimiert sind. Das Zusammenfassen zu Clustern, die Farbdarstellung und die funktionelle Zuschreibung wurden wie in Figur 1 ausgeführt.

Feld B: Expressionsprofile der angezeigten Gene von nicht MYCN-amplifizierten Tumoren im Stadium 1 und im Stadium 4.

Feld C: Kästendrucke (Box-plots) dokumentieren die Verteilung der Expression von Fyn-Kinase und α -Catenin (CTNNA1) in nicht amplifizierten Tumoren unterschiedlicher Stadien und in Tumoren, die ein amplifiziertes MYCN-Gen tragen.

Figur 3: Regulation der Fyn-Kinaseexpression und der Aktivität in Neuroblastom-Stadien.

Feld A: Die oberen Felder zeigen die Westernblot-Analyse von 10 (von 18 getesteten) Tumoren, welche die unterschiedliche Expression des Fyn-Proteins (oben) und des Cdk2 (unten) in Tumoren vom Stadium 1 gegenüber solchen im Stadium 4, und eine unterschiedliche Beweglichkeit in der SDS-Elektrophorese dokumentieren. Die unteren Felder zeigen die Ergebnisse der Phosphatase-Behandlung (λ PP) von immuno-prezipitierter Fyn-Kinase aus zwei Tumoren im Stadium 1.

Feld B: Immunkomplex-Kinase-Assays dokumentieren die Fyn-Kinaseaktivität (gemessen als Autophosphorylierung) in 22 Tumoren des Stadiums 1 und des Stadiums 4.

Feld C: Die Quantifizierung der Ergebnisse ist im Feld C gezeigt.

Feld D: Durchschnittliche Fyn-Kinaseaktivität in Tumoren des Stadiums 1 und des Stadiums 4. Die durchschnittliche Kinaseaktivität der Tumoren im Stadium 4 wurde auf 1 festgesetzt.

Figur 4: Regulation von Zelldifferenzierung und Proliferation des Neuroblastoms durch Fyn.

Feld A: Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von SH-SY5Y-Zellen zeigen die Morphologie repräsentativer Zellen, die mit den Expressionsplasmiden transfiziert wurden, welche für Fyn-Wildtyp (Fynwt) (obere zwei Felder) oder FynK299M (untere Felder) kodieren. Die Zellen sind mit einem Antikörper gefärbt, der gegen Fyn gerichtet ist, und mit Hoechst, um die Kerne sichtbar zu machen.

Feld B: Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse. Gezeigt ist der Prozentsatz der Zellen mit der angegebenen Zahl der Neuriten nach Transfektion mit den angegebenen Expressionsplasmiden (100 Fyn⁺-Zellen wurden für jedes Experiment gezählt).

Feld C: Immunfluoreszenz-Aufnahmen dokumentieren die Morphologie repräsentativer Zellen nach Expression von konstitutiv aktivem AFAP ("AFAPALZ"), oder dominant negativem AFAP ("Δ180-226").

- 5 Feld D: Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse (wie in Feld B).

Feld E: Immunfluoreszenz-Aufnahmen dokumentieren die Morphologie von IMR-32 Zellen nach Expression von Fynwt oder FynK299M.

Feld F: Prozentsatz der gefärbten Zellen, die positiv für Cyclin A sind, in Kulturen von entweder SH-SY5Y oder IMR-32 Zellen, die mit einem Fyn-Expressionvektor transfiziert wurden. Die Zellen wurden sowohl für Fyn als auch für Cyclin A gefärbt, und positive und negative Zellen wurden gesondert gezählt.

Literatur

- 5 Baisden., J.M., Qian, Y., Zot, H.M., and Flynn, D.C. (2001).
The actin filament-associated protein AFAP-110 is an adaptor
protein that modulates changes in actin filament integrity.
Oncogene 20, 6435-47.
- 10 Bergmann, E., Wanzel, M., Weber, A., Shin, I., Christiansen,
H., and Eilers, M. (2001) Expression of P27(KIP1) is
prognostic and independent of MYCN amplification in human
neuroblastoma, Int. J. Cancer 95, 176-83.
- 15 Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K.,
Menkel, A., Eilers, M., and Luscher B. (2001). Regulation of
cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-
dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the
cyclin D2 promoter. Genes Development 15, 2042-7.
- 20 Callow, M.J., Dudoit, S., Gong, E.L., Speed, T.P., and Rubin,
E.M. (2000). Microarray expression profiling identifies genes
with altered expression in HDL-deficient mice. Genome Research
10, 2022-9.
- 25 Clementi, F., Cabrini, D., Gotti, C., and Sher, E. (1986)
Pharmacological characterization of cholinergic receptors in a
human neuroblastoma cell line. J. Neurochem 47, 291-7.
- Dysvik, B., and Jonassen, I. (2001) J-Express: exploring gene
expression data using Java. Bioinformatics 17, 369-370.
- 35 Hegde, P., Qi, R., Abernathly, K., Gay, C., Dharap, S., Gas-
pard, R., Hughes, J.E., Snesrud, E., Lee, N., and
Quackenbusch, J. (2000). A concise guide to cDNA microarray
analysis. Biotechniques 29, 548-50, 552-4, 556 passim.
- 40 Pahlmann, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., and Nils-
son, K., (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma
cells in culture induced by 12-O-tetradodecanoyl-phorbol-13-
acetate. Int J Cancer 28, 583-9.
- Westfall, P.H., and Young, S.S. (1993) Resampling-Based Mul-
tiple Testing. Examples and Methods for p-Valua Adjustment.
- 45 Wolf, R.M., Wilkes, J.J., Chao, M.V., and Resh, M.D., (2001).
Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates
oligodendrocyte differentiation. J. Neurobiol. 49, 62-78.

Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Hgai,
J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA microarray
data: a robust composite method addressing single and multiple
5 slide systematic variation. Nucleic Acids Rerearch 30, e15.

Patentansprüche

1. Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionswegs
über die Proteinkinase Fyn für die Prophylaxe und/oder
Behandlung von Tumorerkrankungen.
2. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 zur Behandlung
von Neuroblastomen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Modulatoren
Inhibitoren von Enzymen sind, die direkt oder indirekt
durch aktives Fyn inhibiert werden.
4. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die zu
einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in den Tumorzellen füh-
ren.
5. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, wobei
die Modulatoren Inhibitoren der Proteinkinase CSK sind.
6. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis
4, wobei die Modulatoren Inhibitoren der Rho-Kinase sind.
7. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis
4, wobei die Modulatoren Inhibitoren der MAP-Phosphatase
sind.
8. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis
4, wobei die Modulatoren Aktivatoren der Protein Kinase C
sind.

9. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen.
- 5 10. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Phosphatasen, die Fyn entgegenwirken, sind.
11. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen.
12. Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionsweges via Proteinkinase Fyn zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung der Metastasenbildung von Tumoren im
15 Frühstadium.
13. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 9, wobei der Tumor ein pädiatrischer oder ein adulter Tumor ist.
- 20 14. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche als Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung neben dem Modulator als Wirkstoff gegebenenfalls Trägerstoffe und/oder Adjuvantien umfaßt.
- 25 15. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator in Form eines pharmakologisch akzeptablen Salzes, Solvates, Hydrates, oder einer pharmakologisch akzeptablen Formulierung vorliegt.
- 30

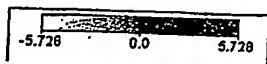
16. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator als Prodrug vorliegt, umfassend den Modulator und mindestens eine pharmakologisch akzeptable Schutzgruppe, die unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird.

5

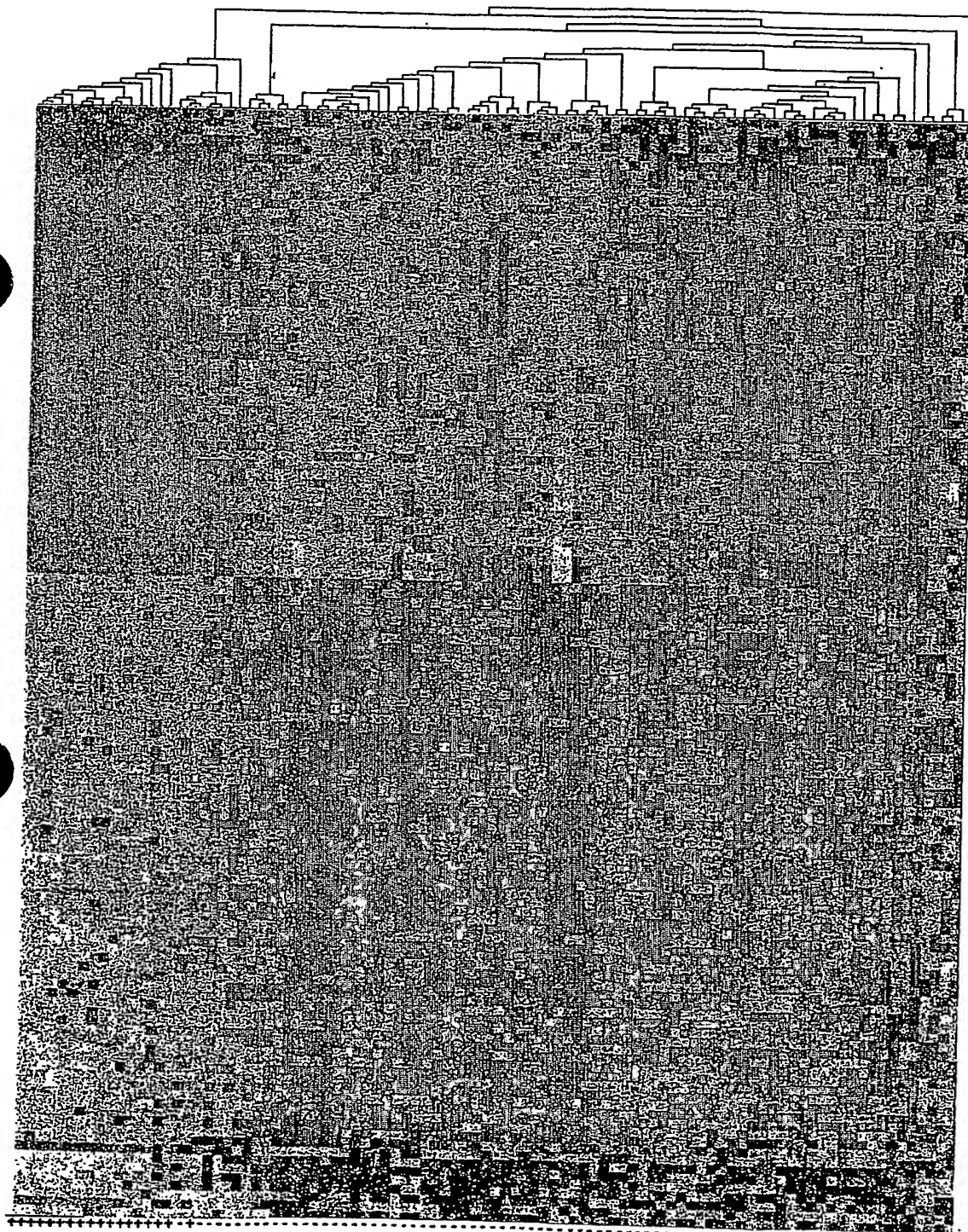
17. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator oral, parenteral, rektal, durch Inhalation, transdermal oder intranasal verabreicht wird.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von
5 Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase
Fyn (wie z. B. Rho-Kinase Inhibitoren oder Inhibitoren der
Proteinkinase CSK) zur Behandlung von Tumorerkrankungen,
insbesondere zur Therapie von Neuroblastom.



C: Cell Cycle + Checkpoints
M: Metabolism
P: Protein Synthesis
S: Signal Transduction



MYCN amplification

Figur 1A Tabelle 1. Teil

p Value	Gene Name	Accession	CMPS
< 0,01	lysyl-tRNA synthetase	AA486220	
< 0,01	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, type II	AA458661	
0,03	anti-oxidant protein 2	AA598874	
< 0,01	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	N68465	
0,03	eukaryotic translation termination factor 1	AA456664	
0,03	hypothetical protein FLJ20624	R26068	
0,04	vav 1 oncogene	T65770	
< 0,01	EST	H54285	
< 0,01	tryptophan 2,3-dioxygenase	T72398	
0,01	transcription factor 6-like 1	AA449118	
< 0,01	eukaryotic translation initiation factor 4E	AA194246	
< 0,01	heat shock protein 75	AA497020	
0,05	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1	H59758	
< 0,01	adenine phosphoribosyltransferase	AA598510	
< 0,01	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	T52362	
0,02	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide (16kD)	H16255	
< 0,01	G protein-coupled receptor 19	H07878	
0,02	glycoprotein A33 (transmembrane)	AA055811	
< 0,01	hypothetical protein 24636	N62562	
< 0,01	solute carrier family 31	R76558	
< 0,01	pancreatic lipase-related protein 1	W45219	
0,04	KIAA1232	R44815	
< 0,01	centromere protein E (312kD)	H94466	
< 0,01	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	R99935	
< 0,01	KIAA1268	T64956	
< 0,01	thrombospondin 1	H80424	
0,03	SMC1	AA598887	
< 0,01	EST	N52517	
< 0,01	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2	T73556	
< 0,01	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	AA480995	
< 0,01	developmentally regulated GTP-binding protein 1	AA488336	
< 0,01	serine dehydratase	T71363	
< 0,01	nonmetastatic protein 23, homolog 1	R53559	
0,01	glutathione-S-transferase like	AA441895	
< 0,01	guanine monophosphate synthetase	N59764	
< 0,01	discoidin domain receptor family, member 2	AA243749	
< 0,01	nuclear factor I/B	W87528	
< 0,01	proThymosin	M26708	
0,02	thioredoxin peroxidase	AA459663	
< 0,01	H2A histone family, member X	H95392	
< 0,01	KIAA0112 protein; homolog of RRS1	AA100613	
< 0,01	ubiquitin specific protease 13	AA190583	
< 0,01	Aurora2	R19158	
< 0,01	carbonic anhydrase III, muscle specific	AA481780	

Figur 1A Tabelle 2. Teil

p Value	Gene Name	Accession	CMPS
0,04	high-mobility group protein isoforms I and Y	AA448261	
0,01	protein disulfide isomerase-related protein	R01669	
0,01	EST	W72814	
< 0,01	p53	H61357	
< 0,01	KIAA0101	W68220	
0,02	ubiquitin carrier protein E2-C	AA430504	
0,04	polymyositis/scleroderma autoantigen 1 (75kD)	AA458994	
< 0,01	MAD2 (mitotic arrest deficient, yeast, homolog)-like 1	AA481076	
< 0,01	purine-rich element binding protein A	AA447793	
< 0,01	clusterin	AA130017	
0,03	tumor differentially expressed 1	H23255	
< 0,01	RAB2	W60890	
0,02	GW128	H62527	
0,03	G protein, beta polypeptide 2	N68166	
0,02	KIAA1681	T80943	
< 0,01	vitamin A responsive; cytoskeleton related	R78725	
< 0,01	peflin	R38031	
< 0,01	nitrogen fixation cluster-like	T55560	
< 0,01	G protein, alpha 12	H79130	
< 0,01	EST	N54088	
0,02	Conserved gene telomeric to alpha globin cluster	AA425757	
0,02	D-dopachrome tautomerase	AA397824	
< 0,01	KIAA0453	R34372	
< 0,01	TBP-associated factor, RNA polymerase II, J, 20kD	AA045588	
< 0,01	actin related protein 2/3 complex, subunit 5 (16 kD)	W55964	
< 0,01	RAP1B, member of RAS oncogene family	W53016	
< 0,01	EST	R33606	
0,05	splicing factor, arginine/serine-rich 4	AA496787	
0,01	stromal cell-derived factor 2	R45235	
0,03	flotillin 2	R73545	
< 0,01	SEMA4D	N50444	
< 0,01	mitogen-activated protein kinase kinase 4	AA293365	
< 0,01	G protein, beta polypeptide 1	AA487912	
0,02	EST	R32840	
0,02	KIAA1025	T72613	
0,01	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	N68458	
0,01	membrane cofactor protein	AA463497	
0,01	KIAA1538	N63748	
< 0,01	hypothetical protein PP3501	N73762	
< 0,01	smg GDS-ASSOCIATED PROTEIN	H16824	
< 0,01	G protein, alpha inhibiting activity polypeptide 1	AA406364	
< 0,01	beta-catenin-interacting protein ICAT	R78539	
< 0,01	SOCS box-containing WD protein, SWIP-1	N57723	
< 0,01	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	N62695	

Figur 1A Tabelle 3. Teil

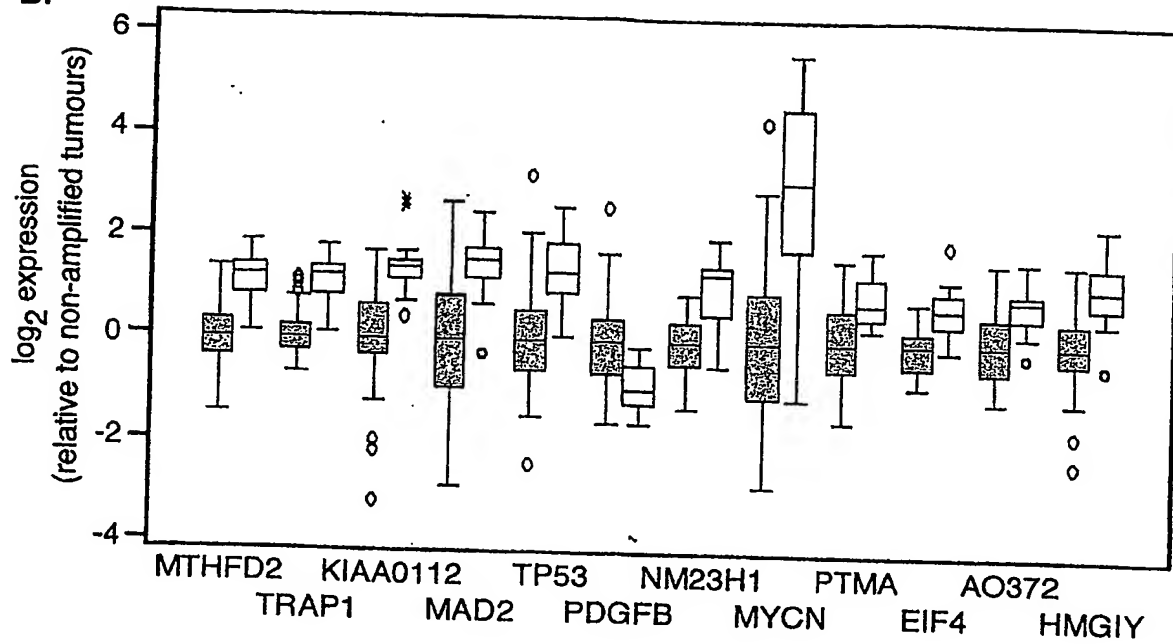
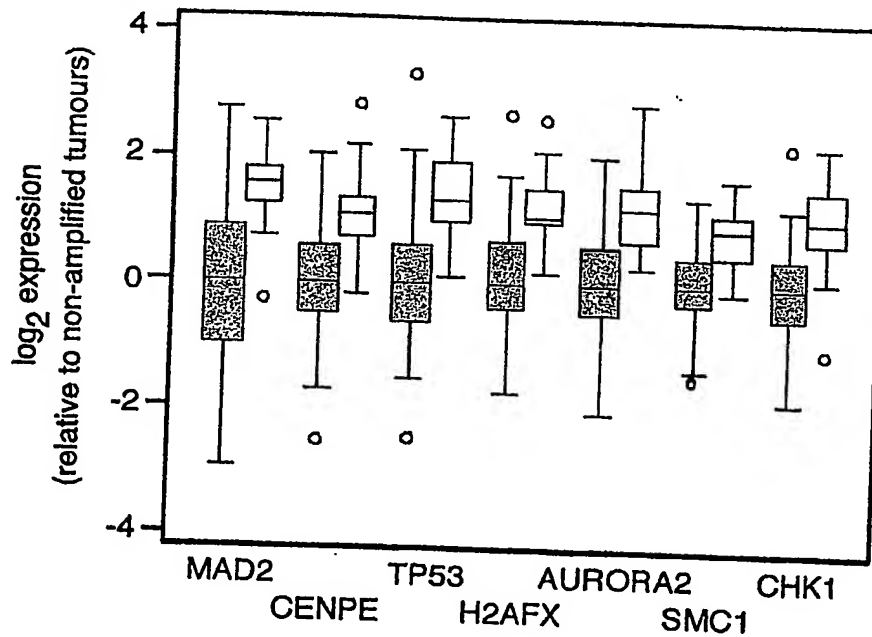
p Value	Gene Name	Accession	C	M	P	S
0,04	cDNA FLJ12900 fis	H68664				
< 0,01	Ephrin B3	AA485665				
< 0,01	junction plakoglobin	R06417				
< 0,01	integral membrane protein 3	AA034213				
< 0,01	hypothetical protein	R63735				
< 0,01	BCL-2-related ovarian killer protein	R87777				
< 0,01	leukemia inhibitory factor receptor	N67017				
< 0,01	platelet-derived growth factor beta polypeptide	W68169				
0,01	endothelin receptor type B	H28710				
< 0,01	thyroid hormone receptor, alpha	T66180				
0,05	protein kinase C, zeta	R24258				
0,04	EST	R93087				
< 0,01	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	R45941				
0,05	KIAA0973 protein	AA479623				
0,05	dickkopf homolog 3	AA425947				
< 0,01	fucosidase, alpha-L- 1	N95761				
< 0,01	ARTS protein (PNUTL)	T64878				
< 0,01	LIM and cysteine-rich domains 1	R63811				
< 0,01	G protein, gamma 2	T80856				
< 0,01	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein	R33841				
< 0,01	regulator of G-protein signalling 7	H24326				
< 0,01	integrin, alpha 8	R87964				
< 0,01	armadillo repeat gene deletes in velocardiofacial syndrome	H17975				
0,02	nerve growth factor receptor	AA378883				
0,02	glutamyl-peptide cyclotransferase	AA282134				
< 0,01	FK506-binding protein 1B (12.6 kD)	R08267				
0,05	EST	N34057				
0,02	splicing factor, arginine/serine-rich 5	R73672				
< 0,01	MSTP032 protein	W60846				
< 0,01	EST	H90531				
< 0,01	contactin 1	R38995				
< 0,01	EST	N54901				
0,02	EST	N69227				
< 0,01	MYCN	R66447				
0,05	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	AA447618				

C: Cell Cycle + Checkpoints

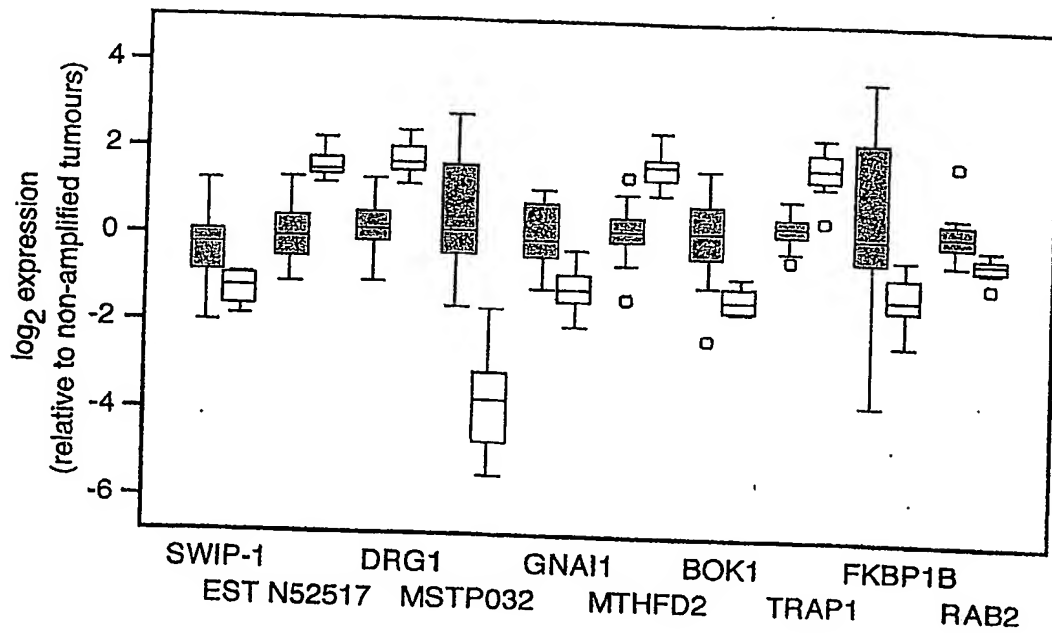
M: Metabolism

P: Protein Synthesis

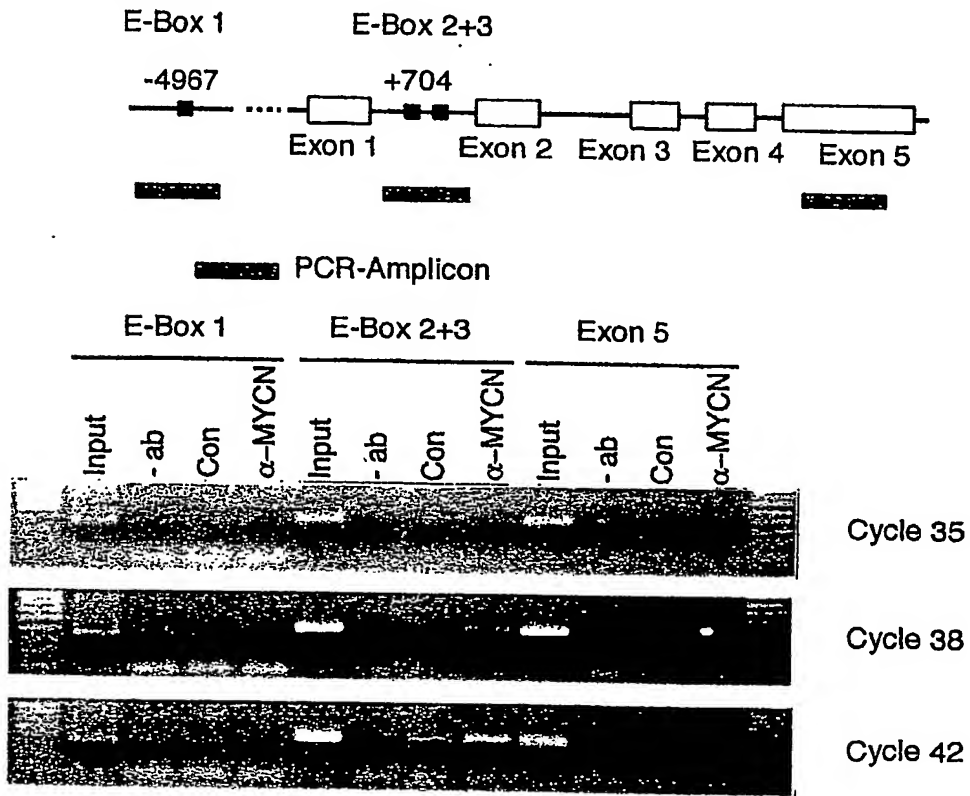
S: Signal Transduction

B. Figure 1B**C.** Figure 1C

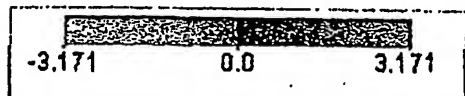
D. Figure 1D



E. Figure 1E



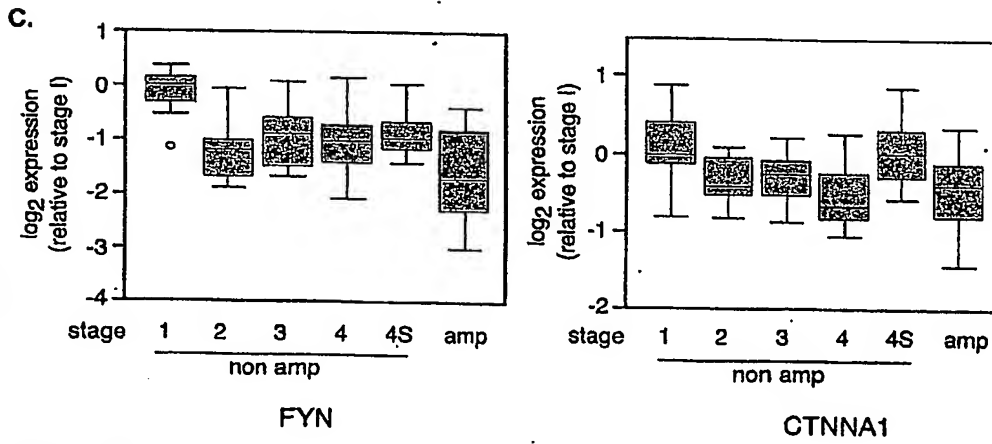
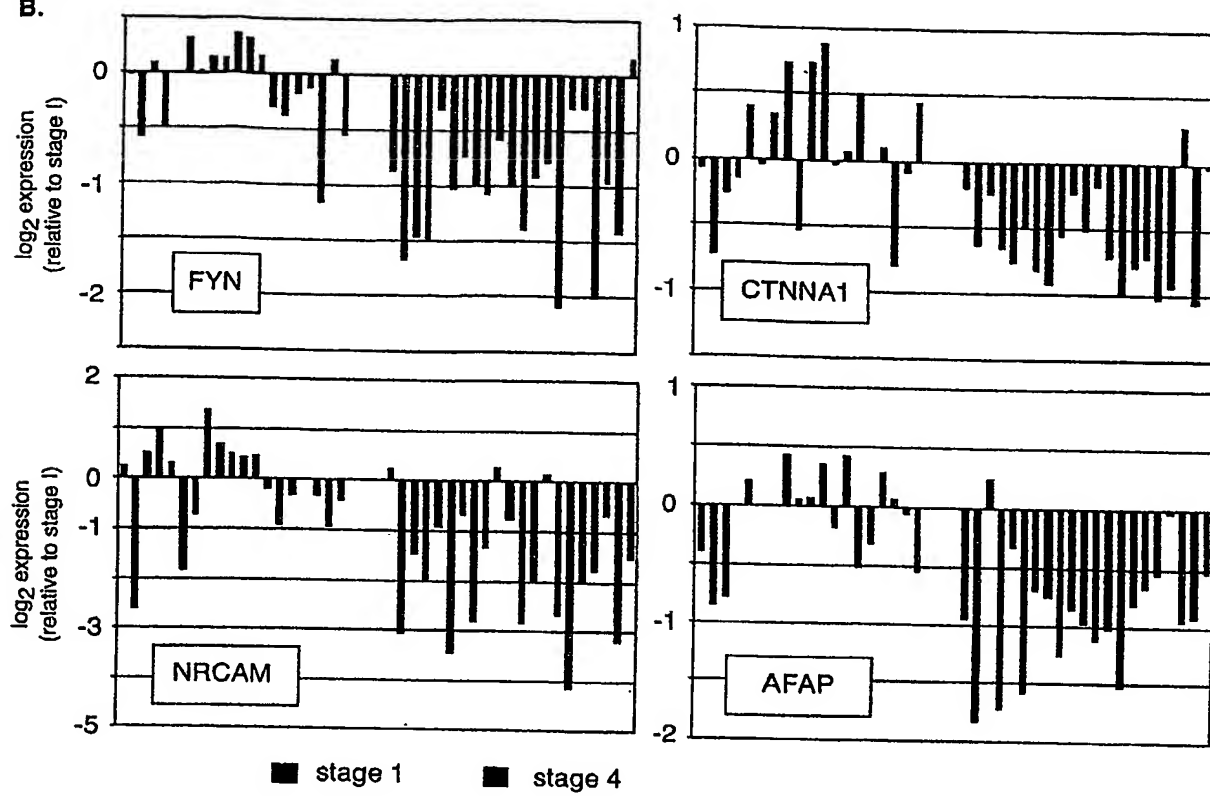
A. Figur 2A Diagramm



Figur 2A Tabelle

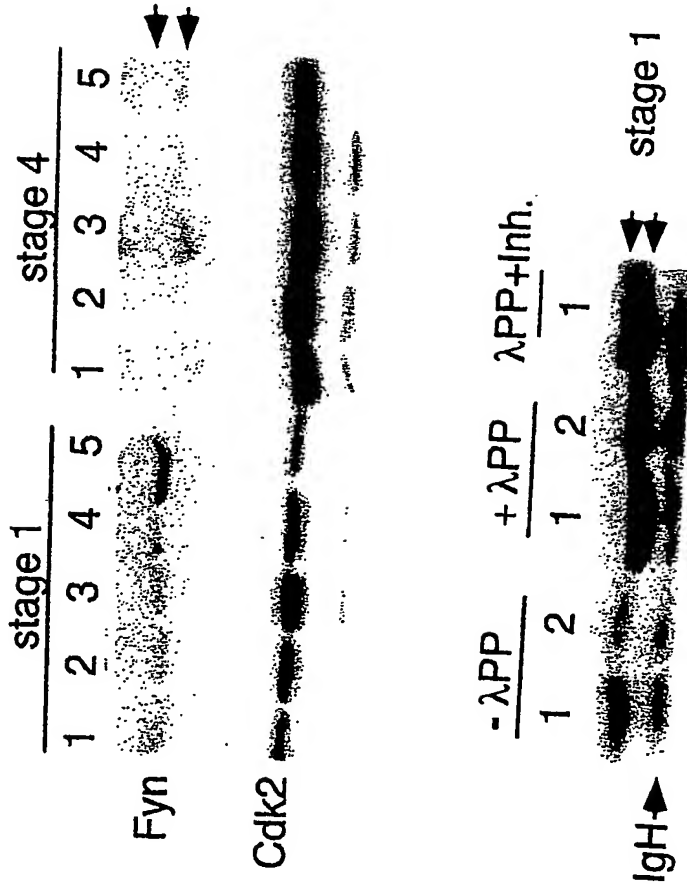
Gene Name	Accession	C	M	P	S
diacylglycerol kinase, delta (130kD)	AA280692	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
solute carrier family 23, member 1	AA461071	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FYN oncogene	N66144	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
v-rat simian leukemia viral oncogene homolog B	W15297	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
hypothetical protein PP3501	N73762	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	H48099	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
actin filament associated protein	R69356	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
GL004	W76342	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
clone FBD3	R93715	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
cyclin T2	R63702	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
alpha-catenin	T29500	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
KIAA0164	H21107	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SOCS box-containing WD protein, SWIP-1	N57723	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
EST	H91164	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
cDNA FLJ12900 fls	H68664	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	R66946	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
tropomodulin	AA235388	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
neuronal cell adhesion molecule	R45583	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
EST	H11658	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
pleiomorphic adenoma gene-like 1	AA463204	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ornithine decarboxylase 1	AA461467	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
protein phosphatase 1, alpha isoform	AA443982	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
HSPC023 protein	W92964	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DKFZP434C128 protein	AA062813	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
chromosome 14 ORF 2	T90621	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
damage-specific DNA binding protein 2	AA410404	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
diphtheria toxin receptor	R45640	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
H1 histone family, member 2	T66815	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	N70010	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ubiquitin carrier protein E2-C	AA430504	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
polymyositis/scleroderma autoantigen 1 (75kD)	AA458994	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L2DTL protein	R06900	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mad2	AA481076	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	R22212	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	R70541	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EST	T95274	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figur 2B

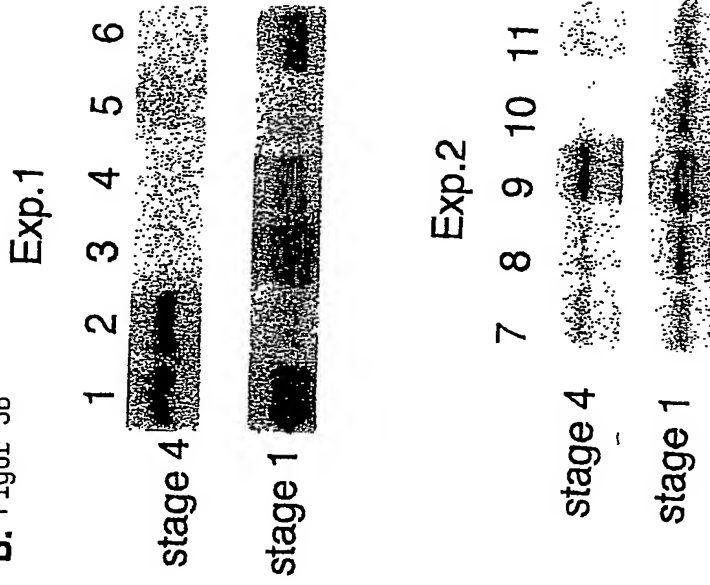


Figur 2C

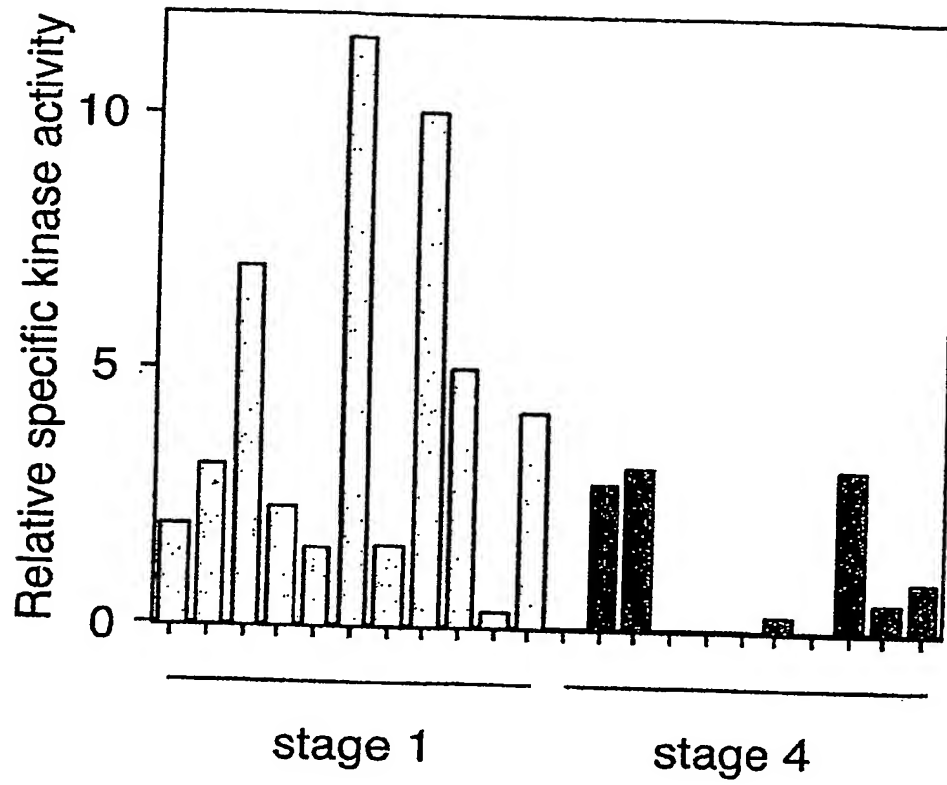
A. Figur 3A



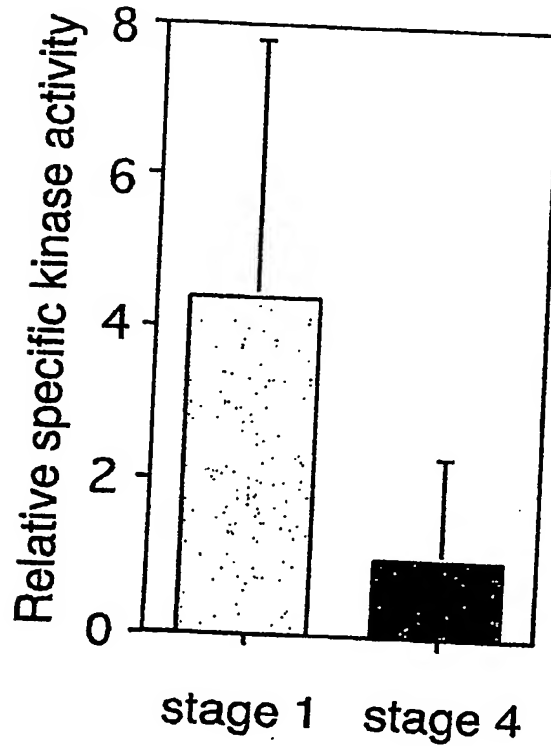
B. Figur 3B



C. Figur 3C



D. Figur 3D

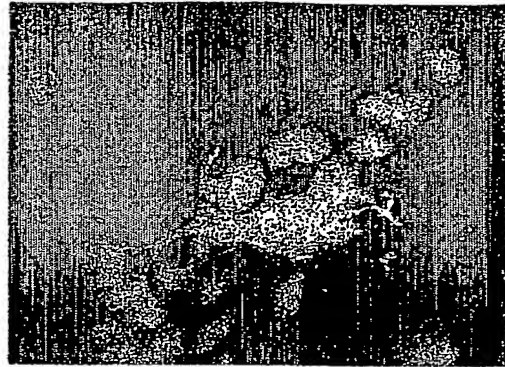


12/14

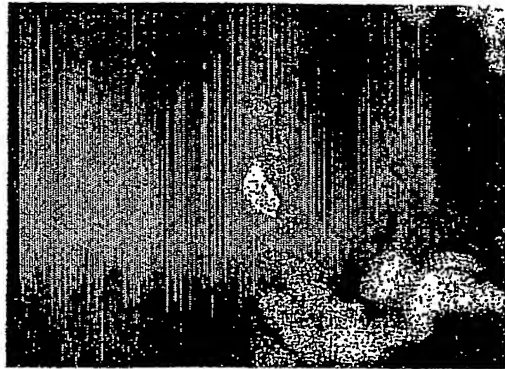
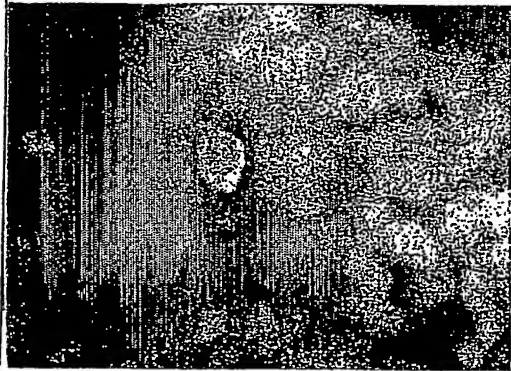
Figur 4A
A.

SH-SY5Y

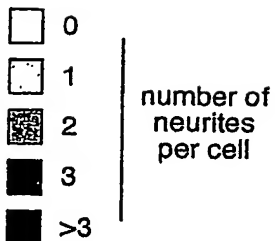
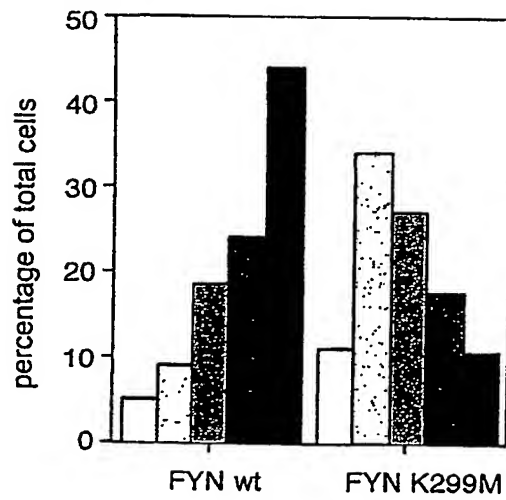
FYN wt



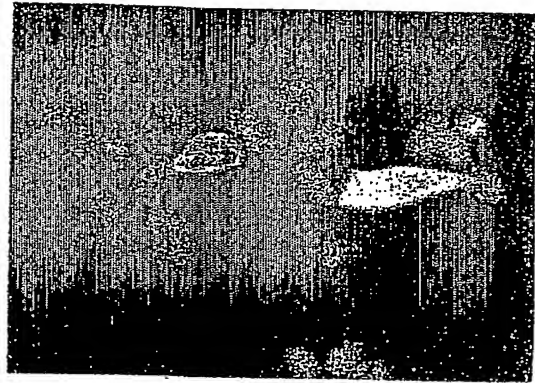
FYN K299M



B. Figur 4B

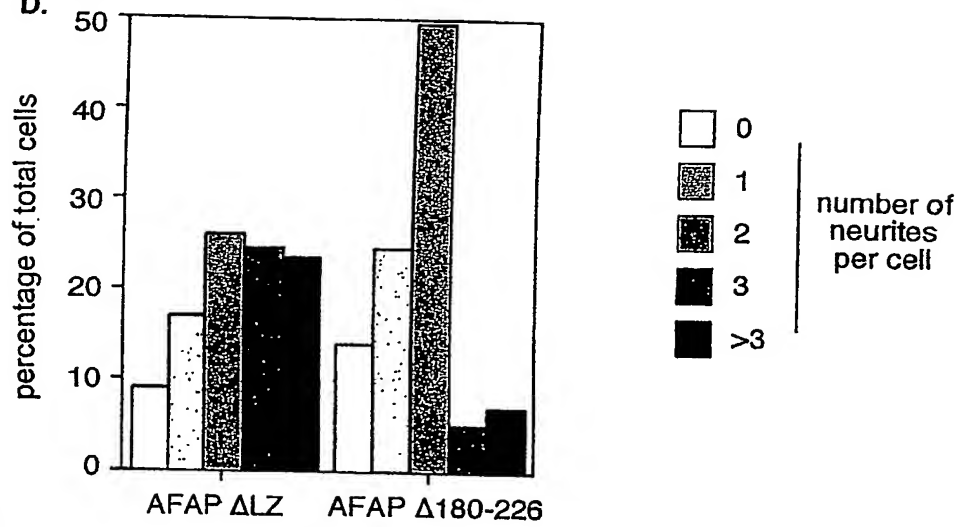


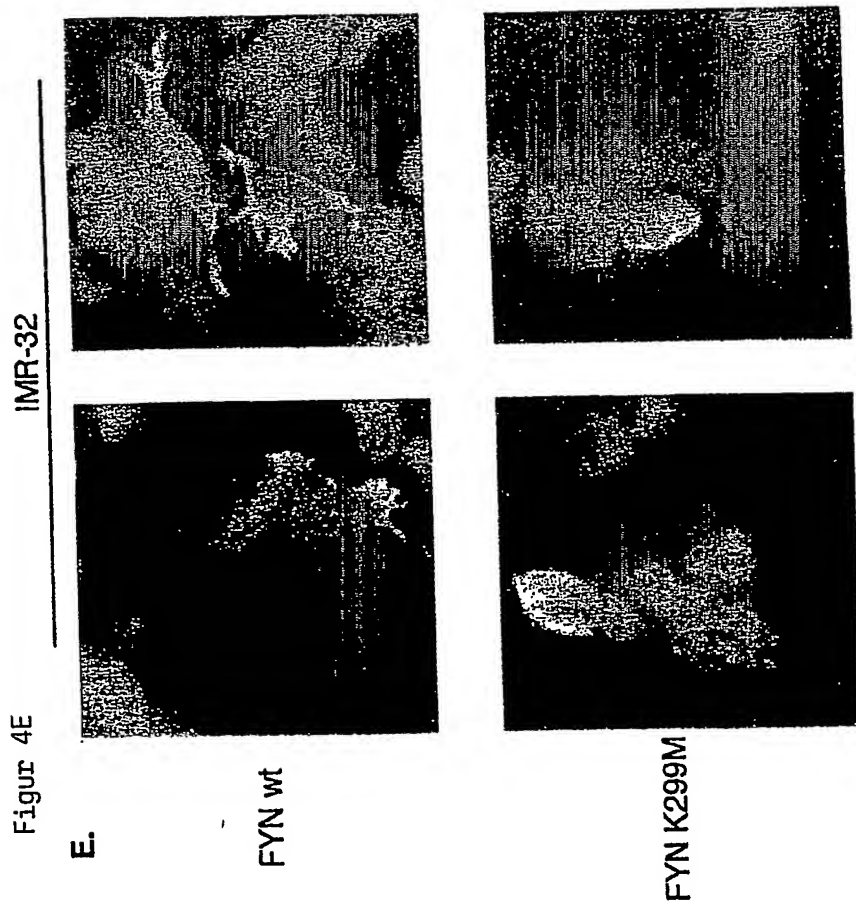
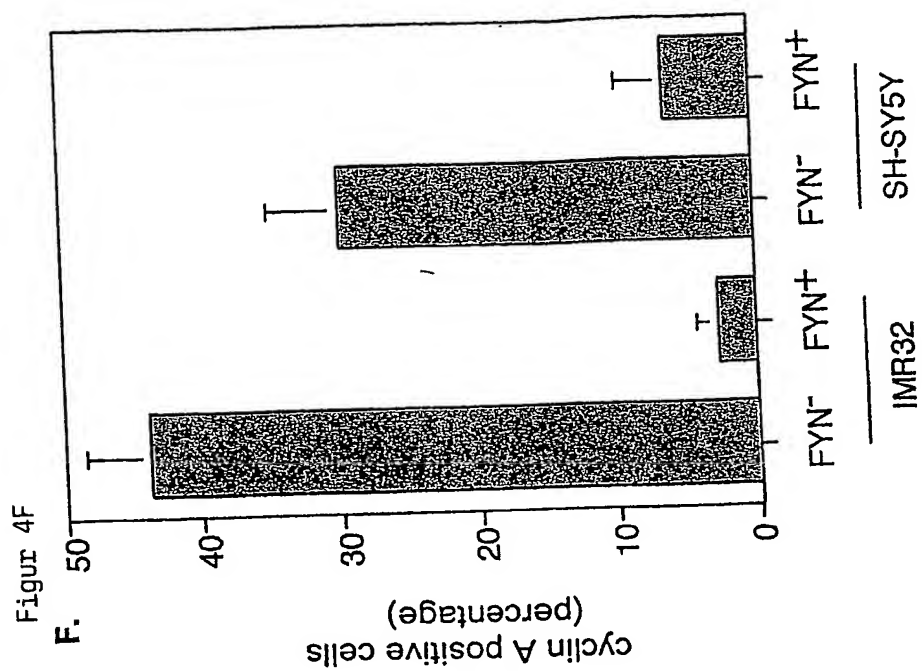
C. Figur 4C

AFAP Δ LZAFAP Δ 180-226

Figur 4D

D.





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.